

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Leiter: Professor Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

Lokalisation und Eigenschaften von Arylamidaseaktivitäten in Makrophagen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. med. vet. Bernd Wagner
aus Fürstenwalde/Spree

1972

Aus dem Immunologischen Forschungslabor
der Freien Universität Berlin
Klinikum Steglitz

Leiter: Professor Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein

Lokalisation und Eigenschaften von Arylamidaseaktivitäten in Makrophagen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. med. vet. Bernd Wagner

aus Fürstenwalde/Spree

Referent: Prof.Dr.rer.nat. Tibor Diamantstein

Korreferent: Prof.Dr.rer.nat.Dr.med. Heinz Tiedemann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 21.6.1972

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Experimenteller Teil	2
2.1. Material und Methoden	2
2.1.1. Gewinnung von Peritonealmakrophagen	2
2.1.2. Gewinnung von Alveolarmakrophagen	2
2.1.3. Präparation der Zellpopulationen	3
2.1.4. Differentialzentrifugation des Zellhomogenats	4
2.1.5. Gewinnung der gereinigten Membranfraktion	5
2.1.6. Messung der Enzymaktivität mit L - Leucyl- β -Naphthylamid $\cdot$ HCl (SERVA) als Substrat (Standardverfahren)	5
2.1.7. Bestimmung des Proteins	6
2.1.8. Untersuchung des Einflusses von Cu^{++} -, Co^{++} -, Mn^{++} -Ionen und p-Chlormercuribenzoessäure Na (pCMB) sowie Methionin auf die Enzymaktivitäten	6
2.1.9. β - Glucuronidase - Bestimmung	8
2.1.10. Untersuchung der Substratspezifität der Arylamidaseaktivitäten in den Zellfraktionen F 2 und F 4	8
2.1.11. Durchführung der Polyacrylamidgel - Elektrophorese	9
3. Ergebnisse und Diskussion	10
3.1. Ausarbeitung der Arylamidase - Aktivitätsbestimmung in Makrophagen mit L-Leucyl- β -Naphthylamid als Substrat	10
3.1.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit und der eingesetzten Proteinmenge	11

3.1.2.	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration	12
3.2.	Vergleich der Arylamidaseaktivitäten in Peritoneal- und Alveolarmakrophagen	13
3.3.	Die intrazelluläre Verteilung der Arylamidase in BCG - induzierten Alveolarmakrophagen	15
3.4.	Vergleich des Verhaltens der Arylamidaseaktivität mit dem Verhalten eines lysosomalen Leitenzyms in der Fraktion F 2 gegen mechanische Beanspruchung und Behandlung mit einem Detergenz (Triton x 100)	21
3.5.	Vergleich der spezifischen Aktivität der Arylamidase in der Fraktion F 2 mit der Arylamidaseaktivität von Zellmembranpräparationen	26
3.6.	Untersuchungen über die Eigenschaften der Arylamidaseaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen	26
3.7.	Untersuchung des Einflusses des pH - Wertes auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen	29
3.8.	Untersuchung des Einflusses von Metallionen auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen	32
3.9.	Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen	33
3.10.	Untersuchung des Einflusses von pCMB auf die Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen	43

3.11.	Untersuchungen des Einflusses von Methionin auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen	47
3.12.	Untersuchung der enzymkatalysierten Spaltung verschiedener Aminosäure - β - Naphthylamide durch die Fraktionen F 2 und F 4	50
3.13.	Elektrophoretische Trennung der Arylamidaseaktivitäten auf Acrylamidgel	52
4.	Zusammenfassung	56
5.	Literaturverzeichnis	60



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

Makrophagen (1,2,3) scheinen neben T - (thymusabhängige Lymphozyten) und B - (bursaäquivalent - abhängige Lymphozyten) Zellen für die Immunantwort von Bedeutung zu sein (4). Das Antigen wird von Makrophagen durch Phagozytose oder Pinozytose aufgenommen und in Phagolysosomen teilweise oder vollständig abgebaut (5). Der Abbau des Antigens innerhalb der Phagolysosomen wird von lysosomal lokalisierten Enzymen katalysiert, von welchen bis jetzt saure Phosphatase, Kathepsin, saure Ribonuklease, Lysozym, Lipase, β - Glucuronidase, saure Desoxyribonuklease und Arylsulphatase in Lysosomen von Makrophagen nachgewiesen und zum Teil näher untersucht worden sind (6,7,8,9). Peptidasen vom Typ der Arylamidase¹⁾ sind von DIENSTL et.al. (10) in Granulozyten und Makrophagen von Meerschweinchen nachgewiesen worden. Über die Eigenschaften und die intrazelluläre Verteilung der Arylamidase in Makrophagen liegen keine Untersuchungen vor.

Aufgabenstellung :

Da die Peptidasen, sofern sie lysosomal lokalisiert

¹⁾ Diese Gruppe von Enzymen, welche die Spaltung von Aminosäure-Arylamiden wie z.B. L-Leucyl- β -naphthylamid katalysieren (11), werden auf Vorschlag von PATTERSON (23) als Arylamidasen bezeichnet (nach I.U.B. Vorschlag Aminoacylnaphthylamid-amidohydrolasen).

sind, für den Abbau des Antigens von Bedeutung sein dürften, ist zur Aufgabe gestellt worden, die intrazelluläre Verteilung und die Eigenschaften der Arylamidaseaktivität in Makrophagen zu untersuchen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Material und Methoden

2.1.1. Gewinnung von Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen wurden aus der Bauchhöhle (8) von 2 - 3 kg schweren weiblichen Neuseeländer - Albino-kaninchen gewonnen. Die Tiere erhielten 50 ml Paraffinöl intraperitoneal injiziert und wurden 4 Tage später getötet. Das Abdomen wurde mit 0,9%iger NaCl - Lösung (0,1%ig an Heparin) ausgespült. Von einem Kaninchen wurden 5×10^6 - 2×10^7 Zellen gewonnen, die zu etwa 90% aus großen mononukleären Zellen bestanden. Bei etwa 30% der Makrophagen waren im Zytoplasma kleinere und größere Paraffinöltröpfchen nachweisbar.

2.1.2. Gewinnung von Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen wurden aus der Lunge (9) von 2 - 3 kg schweren Neuseeländer - Albinokaninchen gewonnen. Zur Induktion von Alveolarmakrophagen erhielten die Tiere intravenös in 0,9%iger NaCl - Lösung suspendierte hitzegetötete BCG (20 mg/Tier) der BEHRING-Werke/Marburg. Eine zweite intravenöse Injektion von

20 mg BCG/Tier erfolgte 4 Wochen nach der Erstinjektion. Die Tiere wurden 4 Wochen nach der Zweitinjektion durch intravenöse Luftinjektion getötet. Die Trachea wurde abgeklemmt und die Lunge wurde in toto herauspräpariert und mit 0,9%iger NaCl - Lösung abgespült. Das Herz wurde durch vorsichtige Präparation von den Lungenflügeln entfernt. Mit 30 - 40 ml 0,9%iger NaCl - Lösung wurden die Lungenflügel 2 - 3 mal durch die Trachea ausgespült. Von einem Kaninchen wurden 5×10^7 - 2×10^8 Zellen gewonnen. Die Zellpopulation bestand zu 90% aus großen mononukleären Zellen. Den Rest bildeten 7 - 8% Lymphozyten und 2 - 3% polymorphkernige Leukozyten. Unter den mononukleären Zellen befand sich eine wechselnde Anzahl von zwei- und mehrkernigen Riesenzellen.

2.1.3. Präparation der Zellpopulationen

Peritoneal - bzw. Alveolarmakrophagen - Suspensionen wurden jeweils gesammelt und bei 200 x g 5 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Jede Zellsuspension wurde 3 mal mit 0.25 M Saccharose gewaschen und anschließend resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dabei auf $2 - 4 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspensionen wurden mit einem Potter - Homogenisator bei 5000 U/Min. 3 - 4 mal im Eisbad jeweils 2 Min. homogenisiert. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Homogenisierungszeiten betrug 4 Min. Das Zellhomogenisat wurde auf nicht

aufgebrochene Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

2.1.4. Differentialzentrifugation des Zellhomogenats zur Gewinnung der einzelnen Zellfraktionen

Nach Abnahme eines aliquoten Teils des Zellhomogenats wurde der restliche Teil einer Differentialzentrifugation unterworfen. Eine die Zellkerne und die unter den angegebenen Bedingungen nicht aufgebrochenen Zellen enthaltende Fraktion F 1 wurde aus dem Zellhomogenat durch Zentrifugation bei $200 \times g$ für 5 Min. gewonnen. Das Sediment wurde in 0.25 m Saccharose resuspendiert. Der Überstand der vorangegangenen Zentrifugation wurde bei $15.000 \times g$ 20 Min. zentrifugiert. Der gewonnene Rückstand, der die lysosomal - mitochondriale Fraktion darstellt, wurde in 0.25 m Saccharose resuspendiert und als Fraktion F 2 bezeichnet. Der Überstand der vorangegangenen Zentrifugation wurde bei $10^5 \times g$ 1 Stunde zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 0.25 m Saccharose resuspendiert und stellt die mikrosomale Fraktion F 3 dar. Der Überstand der vorangegangenen Zentrifugation repräsentiert die von Partikeln befreite zytoplasmatische Fraktion F 4. Alle Fraktionen wurden anschließend 5 mal in einem Kohlensäureeis - Aceton - Gemisch eingefroren bzw. bei $20^{\circ} C$ aufgetaut. Ein aliquoter Teil der Fraktion F 2 ist nach dieser Behandlung nochmals bei $10^5 \times g$ 1 Stunde zentrifugiert wor-

den. Der Rückstand wurde als Fraktion F 2 P (partikelgebunden) und der Überstand als Fraktion F 2 L (löslich) bezeichnet.

2.1.5. Gewinnung der gereinigten Membranfraktion

Nach Abtrennung der Kernfraktion vom Zellhomogenat (2.1.4.) wurde in drei Fällen der Überstand bei $10^3 \times g$ 20 Min. zentrifugiert. Das gewonnene Sediment wurde auf einen Saccharose - Stufengradienten (d 1.12/1.16/1.18) in Anlehnung an EMMELOT (12) modifiziert nach ARNOLD (13) gegeben und für eine Stunde bei $108.000 \times g$ zentrifugiert. Das Material an den Grenzflächen d 1.12/1.16 und 1.16/1.18 wurde entnommen und 20 Min. bei $15.000 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment enthielt eine gereinigte äußere Zellmembranfraktion (elektronenoptische Kontrolle).

2.1.6. Messung der Enzymaktivität mit L - Leucyl - β - naphthylamid $\cdot$ HCl (SERVA) als Substrat (Standardverfahren).

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte in Anlehnung an FELGENHAUER und GLENNER (14) .

Ansatz: 0.05 ml Homogenat bzw. betreffende Zellfraktion
in 0.25 m Saccharose

0.3 ml TRIS - Puffer 0.1 m, pH 7.2

0.1 ml H_2O

0.05 ml Substrat (6×10^{-3} Mol/l) in methanolischer Lösung

Inkubation für 1 Stunde bei $25^{\circ} C$

Anschließend wurde der Ansatz mit 0.5 ml einer GBC-Lösung folgender Zusammensetzung versetzt: 0.1% Echtgranatsalz GBC (FLUKA) und 0.1% Tween 80 in 1 m Acetat - Puffer pH 4.5. Die Extinktionswerte wurden 10 Min. danach mit einem Eppendorf - Photometer bei 546 nm in der 1 cm Mikroküvette gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Der Reagenzienleerwert enthielt anstatt der betreffenden Zellfraktion 0.25 m Saccharose. Aus einer Eichkurve für β - Naphthylamin (proportional von 7×10^{-3} - 7×10^{-4} μMol) wurde die Enzymaktivität (μMol freigesetztes β - Naphthylamin pro Minute und mg Protein) nach Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren errechnet.

2.1.7. Bestimmung des Proteins

Die Bestimmung des Proteins erfolgte mit der Biuret-Methode nach E. LAYNE (15).

2.1.8. Untersuchung des Einflusses von Cu^{++} -, Co^{++} -, Mn^{++} - Ionen und p-Chlormercuribenzoessäure Na (pCMB) sowie Methionin auf die Enzymaktivitäten

Für die Untersuchung des Einflusses von Cu^{++} -, Co^{++} -, Mn^{++} - Ionen und pCMB sowie Methionin auf die Arylamidaseaktivitäten bei Verwendung von L - Leucyl - β - Naphthylamid als Substrat wurde folgender Versuchsansatz verwendet:

Kontrollansatz

0.3 ml TRIS-Puffer 0.1 m, pH 7.2

0.1 ml H₂O

0.05 ml Substrat (6×10^{-3} Mol/l) in methanolischer
Lösung

0.05 ml Zellfraktion in 0.25 m Saccharose

Inkubation für eine Stunde bei 25° C

0.5 ml GBC-Lösung

0.1 ml der zu untersuchenden Substanzen in H₂O

Versuchsansatz

0.3 ml TRIS-Puffer 0.1 m, pH 7.2

0.1 ml der zu untersuchenden Substanzen in H₂O

0.05 ml Substrat (6×10^{-3} Mol/l) in methanolischer
Lösung

0.05 ml Zellfraktion in 0.25 m Saccharose

Inkubation für eine Stunde bei 25° C

0.5 ml GBC-Lösung

0.1 ml H₂O

Die Extinktionswerte wurden 10 Min. danach gegen einen
Reagenzienleerwert folgender Zusammensetzung gemessen:

Reagenzienleerwert

0.3 ml TRIS-Puffer 0.1 m, pH 7.2

0.1 ml H₂O

0.05 ml Substrat (6×10^{-3} Mol/l) in methanolischer
Lösung

Inkubation für eine Stunde bei 25° C

0.5 ml GBC-Lösung

0.05 ml Zellfraktion in 0.25 m Saccharose

0.1 ml H_2O

Bei der Präinkubation der betreffenden Zellfraktion mit den Metallionen wurde die gleiche Versuchsanordnung verwendet mit dem Unterschied, daß die Ansätze ohne Substrat für 30 Min. bei $25^{\circ}C$ inkubiert wurden. Danach erfolgte die Inkubation mit Substrat für eine Stunde bei $25^{\circ}C$ und im weiteren wurde wie oben beschrieben verfahren.

Folgende Substanzen wurden verwendet:

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ p.A. (MERCK), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ p.A. (MERCK),
 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ p.A. (MERCK), pCMB (SERVA), L-Methionin
p.A. (SERVA).

2.1.9. β - Glucuronidase - Bestimmung

Als lysosomales Leitenzym wurde β - Glucuronidase nach FISHMAN (16) bestimmt.

2.1.10. Untersuchung der Substratspezifität der Aryl- amidaseaktivitäten in den Zellfraktionen F 2 und F 4

Die Enzymaktivitäten wurden nach dem Standardverfahren (2.1.6.) bestimmt. Anstelle von L - Leucyl - β - Naphthylamid wurden folgende Substrate in einer Konzentration von 10^{-3} Mol/l eingesetzt: L - Phenylalanyl -, L - Tyrosyl -, L - Lysyl -, N - Benzoyl - d, l - Arginyl -

und L - Cystyl - di- β - Naphthylamid (MANN RESEARCH LABORATORIES, INC., NEW YORK).

2.1.11. Durchführung der Polyacrylamidgel - Elektrophorese

Die nach 2.1.4. behandelten Zellfraktionen sind 1 Stunde bei 4° C mit 5%igem (Endkonzentration) Triton X-100 inkubiert worden. 50 - 300 μ l der so behandelten Fraktionen wurden auf Acrylamidgelsäulen aufgetragen. Es wurde ein 7%iges Acrylamidgel nach DAVIS (17) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in Glycin - Puffer (0.05 M, pH 8.6) und 2 mA pro Röhrchen für 70 Min. Der Nachweis der Arylamidaseaktivität erfolgte nach BURSTONE und FOLK (18) durch Inkubation des Acrylamidgels für 30 Min. in einer Lösung folgender Zusammensetzung:

10 mg L - Leucyl - β - Naphthylamid HCl in 80 ml H₂O

20 ml TRIS - Puffer 0.2 M, pH 7.1

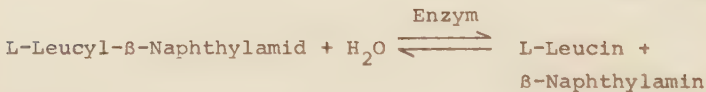
60 mg Echtgranatsalz GBC

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Ausarbeitung der Arylamidase - Aktivitätsbestimmung in Makrophagen mit L - Leucyl - β - Naphthylamid als Substrat

Um einen Enzymaktivitätstest für dieses Zellmaterial auszuarbeiten, wurde die von FELGENHAUER und GLENNER (14) angegebene Methode modifiziert. Die Modifikation erwies sich als notwendig, da die optimale Substratkonzentration, wie die anschließenden Untersuchungen zeigen, mit den von FELGENHAUER und GLENNER (14) für Milzextrakte angegebenen optimalen Substratkonzentrationen nicht identisch waren.

Prinzip: L - Leucyl - β - Naphthylamid wird in Gegenwart des Enzyms Arylamidase zu L - Leucin und β -Naphthylamin hydrolysiert.



Naphthylamin wird anschließend in Acetat - Puffer mit Echtgranatsalz GBC gekuppelt und das entstandene orange-farbene Reaktionsprodukt photometrisch bei 546 nm Hg bestimmt.

Es wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der eingesetzten Enzymmenge, Inkubationszeit und Substratkonzentration bestimmt.

3.1.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationszeit und der eingesetzten Proteinmenge

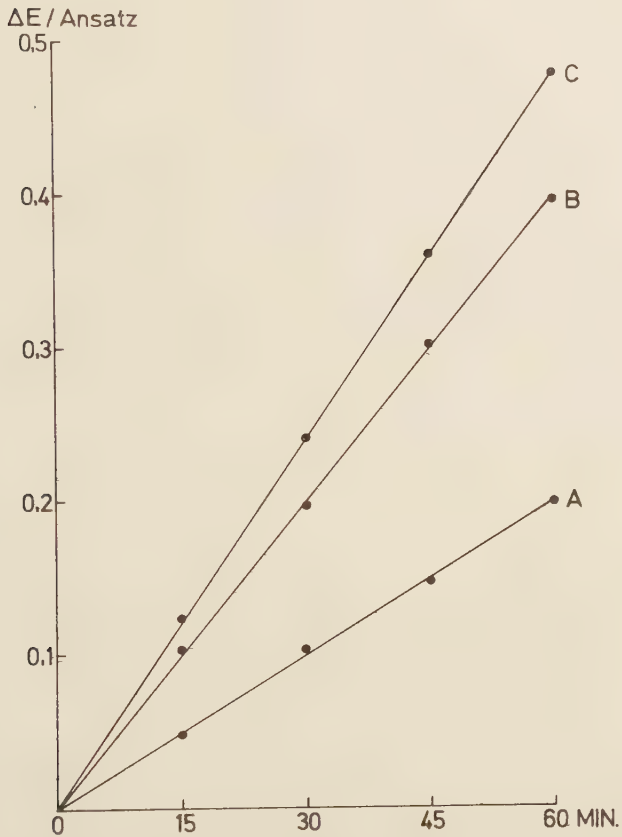


Abb. 1. Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgte in dem Gesamthomogenat nach dem Standardverfahren (2.1.6.).
A = 15 μg Protein/Ansatz. B = 30 μg Protein/Ansatz.
C = 40 μg Protein/Ansatz.

3.1.2. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration

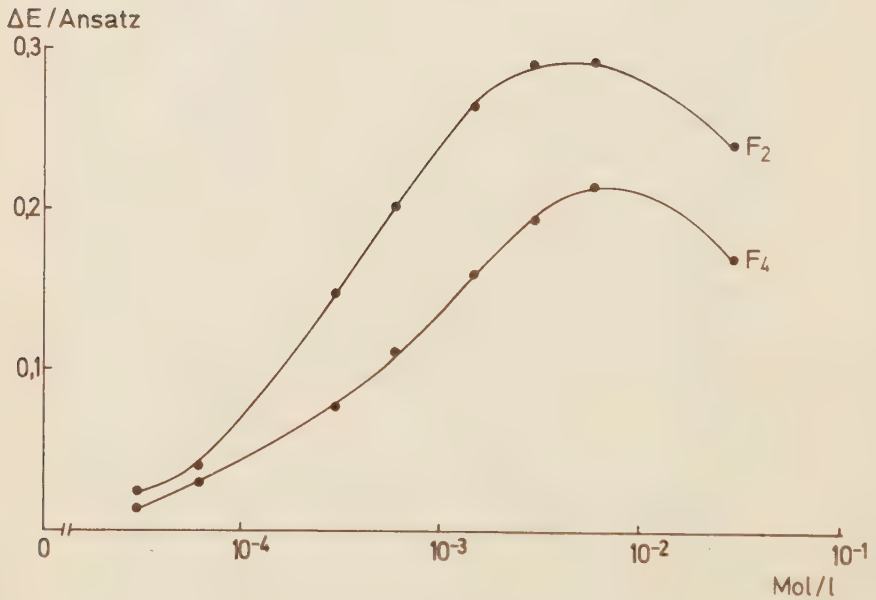


Abb. 2. Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgte in den Fraktionen F 2 und F 4 nach dem Standardverfahren (2.1.6.). Die eingesetzte Proteinmenge betrug in der Fraktion F 2 = 7.8 μg Protein/Ansatz und in der Fraktion F 4 = 27.4 μg Protein/Ansatz.

Wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich ist, besteht bei einer optimalen Substratkonzentration von 6×10^{-3} Mol/l und unter den angegebenen Versuchsbedingungen eine Proportionalität zwischen Enzymaktivität und Inkubationszeit bzw. Enzymmenge. Im Gegensatz zu FELGENHAUER und GLENNER (14) erwies es sich als notwendig, eine um eine Zehnerpotenz niedrigere Substratkonzentration zu verwenden. Bei der von den obengenannten Autoren benutzten Substratkonzentration trat bei allen Fraktionen eine deutliche Substrathemmung auf. Das Substrat wurde wegen der schlechten Wasserlöslichkeit in Methanol gelöst den Ansätzen zugegeben.

3.2. Vergleich der Arylamidaseaktivitäten in Peritoneal- und Alveolarmakrophagen

COHN et al. (6) sowie MYRWICK et al. (8) zeigten, daß Unterschiede in den Aktivitäten verschiedener Enzyme zwischen BCG - induzierten Alveolar - und Peritonealmakrophagen bestehen. Aus diesem Grunde wurden zuerst die Arylamidaseaktivitäten von Alveolar - und Peritonealmakrophagen miteinander verglichen. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich (Tab. 1), ist die Arylamidaseaktivität in Alveolarmakrophagen um das 4 fache höher als in Peritonealmakrophagen. DIENSTL et al. (10) fanden in Peritonealmakrophagen von Meerschweinchen eine Arylamidaseaktivität von $1.412 \text{ IE}/10^{12}$ Zellen. Paraffinöl-

Tabelle 1

Vergleich der Arylamidaseaktivitäten von Peritoneal-
und Alveolarmakrophagen

Spezifische Aktivitäten ¹⁾		
Tier Nr.	Alveolarmakrophagen	Peritonealmakrophagen
1	6 540	1 440
2	3 310	1 050
3	3 230	985
4	5 690	1 633
5	4 320	830
6	5 790	1 290
7	6 345	1 785
8	3 905	880
$\bar{x}$	4 891	1 236
S	1 354	357

¹⁾ Die spezifische Aktivität ist als μMol freigesetztes β - Naphthylamin pro Minute und pro 10^{12} Makrophagen ausgedrückt.

induzierte Peritonealmakrophagen von Kaninchen zeigten mit demselben Substrat eine Arylamidaseaktivität von $1\,236\text{ IE}/10^{12}$ Zellen. Beide Untersuchungen sind zwar nicht direkt vergleichbar, da von DIENSTL et.al. (10) ein Barbitat - Acetat Puffer pH 7.1, dagegen in den eigenen Versuchen ein TRIS - Puffer pH 7.2 verwendet wurde. Trotzdem zeigt die relativ gute Übereinstimmung der Arylamidaseaktivitäten bei Peritonealmakrophagen von Meerschweinchen und Kaninchen, daß beide Zellpopulationen Arylamidase in gleicher Größenordnung enthalten. Bei den von COHN et.al. (6) und MYRWICK et.al. (8) untersuchten Enzymen handelt es sich ausschließlich um lysosomale Leitenzyme. Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob es sich bei der Arylamidase gleichfalls um ein lysosomal lokalisiertes Enzym handeln könnte. Aus diesem Grunde wurde das vorliegende Zellhomogenat durch Differentialzentrifugation weiter aufgetrennt und in den einzelnen Fraktionen die Arylamidaseaktivität bestimmt.

3.3. Die intrazelluläre Verteilung der Arylamidase in BCG - induzierten Alveolarmakrophagen

Da die BCG - induzierten Alveolarmakrophagen die höchste Aktivität an Arylamidase aufwiesen, wurden für die weiteren Untersuchungen Alveolarmakrophagen verwendet. BCG - induzierte Alveolarmakrophagen von Kaninchen

(Gewinnung der Makrophagen s. methodischer Teil) wurden durch Differentialzentrifugation (Einzelheiten s. methodischer Teil) in 4 Fraktionen getrennt. Fraktion F 1 repräsentiert die Zellkerne und die unter den angewandten Bedingungen nicht aufgebrochenen Zellen. Fraktion F 2 enthält die Mitochondrien, die Lysosomen und die Zellmembranen, während die Fraktion F 3 aus dem endoplasmatischen Retikulum besteht. Die Fraktion F 4 ist der nach einstündigem Zentrifugieren bei $10^5 \times g$ von Zellpartikeln befreite Überstand. Die einzelnen Fraktionen sind elektronenoptisch kontrolliert worden¹⁾. Die spezifische Aktivität (Tab. 2) und die intrazelluläre Verteilung (Tab. 3) des Enzyms wurden in den einzelnen Zellfraktionen und in dem Homogenat von BCG - induzierten Alveolarmakrophagen bei 8 Kaninchen bestimmt. Die Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgten nach dem Standardverfahren (2.1.6.). Protein wurde mit der Biuret - Methode nach LAYNE (15) bestimmt. Die spezifische Aktivität der Arylamidase in Alveolarmakrophagen von Kaninchen ist 4 mal so hoch wie es MAHADEVAN und TAPPEL (20) in Leber und Nieren von Ratten unter vergleichbaren Bedingungen gefunden haben. Histochemische Arbeiten von SYLVEN und SVENSSON (21) bzw. die Arbeiten von FELGENHAUER und GLENNER (14), SMITH et.al. (22) sowie MAHADEVAN und TAPPEL (20)

¹⁾ Für diese Untersuchung bin ich Herrn Dr. Graf v. Keyserlingk vom Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin zu Dank verpflichtet

Tabelle 2

Spezifische Aktivität¹⁾ der Arylamidase in den subzellulären Fraktionen von
Alveolarmakrophagen

Zellfraktion	Spezifische Aktivität bei pH 7.2								$\bar{x}$	S
	Tier Nr.									
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Homogenat	11.1	8.8	9.9	9.3	17.3	13.2	9.9	10.5	11.3	2.8
F 1	21.5	12.4	4.4	8.4	3.3	7.3	2.8	10.3	8.8	6.2
F 2	28.9	16.7	14.9	11.1	14.7	21.4	21.5	12.5	17.7	5.9
F 3	2.6	5.8	3.7	4.0	2.1	5.0	5.7	8.2	4.6	1.9
F 4	6.2	7.2	5.2	8.2	8.5	8.1	9.2	5.6	7.3	1.5

1) Die spezifische Aktivität ist als m μ Mol freigesetztes β - Naphthylamin/Min. und mg Protein ausgedrückt.

Tabelle 3

Verteilung der Arylamidaseaktivitäten¹⁾ in den subzellulären Fraktionen der Alveolarmakrophagen

Zellfraktion	Tier Nr.								$\bar{x}$	S
	1	2	3	4	5	6	7	8		
F 1	14.2	7.9	5.0	10.9	4.0	11.1	7.9	11.9	9.1	3.5
F 2	64.3	65.7	62.7	64.0	62.4	60.7	52.5	53.7	60.8	4.9
F 3	2.2	1.7	2.2	1.3	1.6	1.2	4.3	5.5	2.5	1.5
F 4	19.3	24.7	30.1	23.8	32.0	27.0	35.3	28.8	27.6	5.0
Wiedergefundene Aktivität	78.0	89.6	80.0	82.7	75.6	87.9	85.3	81.9	82.6	4.8

¹⁾ Die Aktivität ist auf die wiedergefundene Aktivität = 100 bezogen

machen es wahrscheinlich, daß die Arylamidaseaktivität in den von ihnen untersuchten Geweben im Gegensatz zu der Leucinaminoneptidase (23) lysosomal lokalisiert ist. Die intracelluläre Verteilung der Arylamidase in Alveolarmakrophagen zeigt, daß der Hauptanteil der Arylamidaseaktivität ebenfalls in einer lysosomenreichen Fraktion anzutreffen ist. Ein Vergleich der in dieser Arbeit enthaltenen Ergebnisse mit Arbeiten von COHN et.al. (6,7) und von EMMELOT (12) läßt allerdings Zweifel aufkommen, ob die Arylamidase ausschließlich lysosomal lokalisiert sein kann. COHN et.al. (6) fanden bei dem gleichen Fraktionierungsverfahren, daß 90% der lysosomalen Enzyme in der mitochondrial - lysosomalen Fraktion anzutreffen sind. Das zur Kontrolle der Zellfraktionen bestimmte Leitenzym β - Glucuronidase (Tab. 4) ist zu 75% in dieser Fraktion wiedergefunden worden, die Arylamidase hingegen nur zu 60.8%, während 27.6% in dem von Partikeln befreiten Überstand anzutreffen war. Berücksichtigt man außerdem die in Kapitel 3.7 besprochenen Ergebnisse, nachdem die in den Fraktionen F 2 und F 3 gefundenen Arylamidaseaktivitäten bei pH 6.0, die Aktivität in der Fraktion F 4 dagegen zwischen pH 8.0 - 8.5 das pH - Optimum hat und korrigiert die bei pH 7.2 erhaltenen Werte auf Werte, die man bei dem optimalen pH der betreffenden Fraktion

Tabelle 4

Vergleich der intrazellulären Verteilung der Aryl-
amidase und β - Glucuronidase in Alveolarmakrophagen¹⁾

Fraktion	Arylamidase	S	β - Glucuronidase	S
F 1	9.1	3.5	12.5	4.7
F 2	60.8	4.9	75.0	6.1
F 3	2.5	1.5	4.1	2.3
F 4	27.6	5.0	8.4	4.7

1) Die Aktivität ist auf die wiedergefundene Aktivität bezogen (= 100). Arylamidase ist nach dem Standardverfahren (2.1.6.) und β - Glucuronidase mit Phenolphthaleinglucuronid als Substrat (2.1.9.) bestimmt worden.

erhält, so ergeben sich für die Fraktion F 4 die gleichen Aktivitäten wie in der Fraktion F 2. Die Schwankungen der Enzymaktivitäten in der Fraktion F 1 können auf die Uneinheitlichkeit dieser Fraktion, bedingt durch Schwankungen in der Reproduzierbarkeit der Zellhomogenisation, zurückgeführt werden. Ob eine reine Kernfraktion Arylamidaseaktivitäten enthält, läßt sich aufgrund dieser Versuche nicht entscheiden. Es muß ebenfalls offen bleiben, ob die geringe Aktivität (2.5%) in der mikrosomalen Fraktion F 3 eine Verunreinigung oder ein mikrosomales Enzym repräsentiert. Nach EMMELOT (12) enthalten auch die Zellmembranen von Leberzellen L - Leucyl - β - Naphthylamid hydrolysierende Enzyme, so daß in der Fraktion F 2 anzutreffende Arylamidaseaktivitäten nicht unbedingt oder ausschließlich lysosomal lokalisiert sein müssen.

3.4. Vergleich des Verhaltens der Arylamidaseaktivität mit dem Verhalten eines lysosomalen Leitenzyms in der Fraktion F 2 gegen mechanische Beanspruchung und Behandlung mit einem Detergenz (Triton x 100)

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, ist unter den angewandten Arbeitsbedingungen 60.8% der Arylamidaseaktivität in der lysosomenreichen und die Zellmembranen enthaltende Fraktion und 27.6% der Aktivität in der von Partikeln befreiten Fraktion vorzufinden.

Die Verteilung der Aktivität eines lysosomalen Leitenzyms (β - Glucuronidase) weicht hiervon ab. β - Glucuronidase ist zu 75% in der Fraktion F 2 und zu 8.4% in dem von Partikeln befreiten Überstand der Zellpräparationen vorhanden. Unterwirft man Lysosomen einem mehrmaligen Kälteschock und trennt anschließend durch Zentrifugation die durch diese Behandlung aufgeplatzten Lysosomen in einen partikelfreien Überstand und in einen die Lysosomenmembranen enthaltenden Rückstand, so findet man, daß ein lysosomales Enzym wie β - Glucuronidase zum größten Teil in Lösung gegangen ist (Tab. 5). Es ist deshalb anzunehmen, daß Lysosomen während der Präparation der Zellfraktionen - wenn auch nur geringfügig - geschädigt wurden, wodurch 8 - 10% der Aktivität in die Fraktion F 4 gelangten. In einem weiteren Versuch wurde die Fraktion F 2 einer 5 maligen Kälteschockbehandlung unterworfen und der durch diese Behandlung freisetzbare bzw. noch an Partikeln gebundene Anteil der Aktivität der Arylamidase mit den entsprechenden Aktivitätsanteilen eines lysosomalen Leitenzyms verglichen (Tab. 5).

Nicht ionische Detergenzien z.B. Triton x 100 sind geeignet (24) an Partikeln oder Zellmembranen haftende Enzyme abzulösen oder zumindest in eine bei $10^5 \times g$ nicht abzentrifugierbare Form zu überführen. Deshalb wurde versucht, durch Behandlung mit Triton x 100 die an den Partikeln haftende Aktivität von Arylamidase

erhält, so ergeben sich für die Fraktion F 4 die gleichen Aktivitäten wie in der Fraktion F 2. Die Schwankungen der Enzymaktivitäten in der Fraktion F 1 können auf die Uneinheitlichkeit dieser Fraktion, bedingt durch Schwankungen in der Reproduzierbarkeit der Zellhomogenisation, zurückgeführt werden. Ob eine reine Kernfraktion Arylamidaseaktivitäten enthält, läßt sich aufgrund dieser Versuche nicht entscheiden. Es muß ebenfalls offen bleiben, ob die geringe Aktivität (2.5%) in der mikrosomalen Fraktion F 3 eine Verunreinigung oder ein mikrosomales Enzym repräsentiert. Nach EMMELLOT (12) enthalten auch die Zellmembranen von Leberzellen L - Leucyl - β - Naphthylamid hydrolysierende Enzyme, so daß in der Fraktion F 2 anzutreffende Arylamidaseaktivitäten nicht unbedingt oder ausschließlich lysosomal lokalisiert sein müssen.

3.4. Vergleich des Verhaltens der Arylamidaseaktivität mit dem Verhalten eines lysosomalen Leitenzyms in der Fraktion F 2 gegen mechanische Beanspruchung und Behandlung mit einem Detergenz (Triton x 100)

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, ist unter den angewandten Arbeitsbedingungen 60.8% der Arylamidaseaktivität in der lysosomenreichen und die Zellmembranen enthaltende Fraktion und 27.6% der Aktivität in der von Partikeln befreiten Fraktion vorzufinden.

Die Verteilung der Aktivität eines lysosomalen Leitenzyms (β - Glucuronidase) weicht hiervon ab. β - Glucuronidase ist zu 75% in der Fraktion F 2 und zu 8.4% in dem von Partikeln befreiten Überstand der Zellpräparationen vorhanden. Unterwirft man Lysosomen einem mehrmaligen Kälteschock und trennt anschließend durch Zentrifugation die durch diese Behandlung aufgeplatzten Lysosomen in einen partikelfreien Überstand und in einen die Lysosomenmembranen enthaltenden Rückstand, so findet man, daß ein lysosomales Enzym wie β - Glucuronidase zum größten Teil in Lösung gegangen ist (Tab. 5). Es ist deshalb anzunehmen, daß Lysosomen während der Präparation der Zellfraktionen - wenn auch nur geringfügig - geschädigt wurden, wodurch 8 - 10% der Aktivität in die Fraktion F 4 gelangten. In einem weiteren Versuch wurde die Fraktion F 2 einer 5 maligen Kälteschockbehandlung unterworfen und der durch diese Behandlung freisetzbare bzw. noch an Partikeln gebundene Anteil der Aktivität der Arylamidase mit den entsprechenden Aktivitätsanteilen eines lysosomalen Leitenzyms verglichen (Tab. 5).

Nicht ionische Detergenzien z.B. Triton x 100 sind geeignet (24) an Partikeln oder Zellmembranen haftende Enzyme abzulösen oder zumindest in eine bei $10^5 \times g$ nicht abzentrifugierbare Form zu überführen. Deshalb wurde versucht, durch Behandlung mit Triton x 100 die an den Partikeln haftende Aktivität von Arylamidase

Tabelle 5

Einfluß der Kältebehandlung auf die Löslichkeit der
Arylamidase im Vergleich zu einem lysosomalen Enzym
in der Fraktion F 2 ¹⁾

Tier Nr.	Arylamidase	β - Glucuronidase
1	11	75
2	18	78
3	7	69
4	10	77
5	17	80
6	12	68
7	9	77
8	14	75
$\bar{x}$	12.3	74.9
S	3.8	4.3

¹⁾ Die in der Tabelle angegebenen Werte stellen Prozente der Enzymaktivität dar, die nach 5 maliger Kältebehandlung (Kohlensäureeis/Aceton - Gemisch) der Fraktion F 2 und anschließender Zentrifugation bei $10^5 \times g$ in dem partikelfreien Überstand anzutreffen sind (2.1.4.)

und β - Glucuronidase aus der Fraktion F 2 in eine lösliche Form zu überführen. Wie die Ergebnisse in der Tabelle 6 zeigen, lassen sich beide untersuchten Enzyme durch eine einstündige Einwirkung von 5%igem Triton x 100 vollständig aus einer partikelgebundenen in eine lösliche Form überführen. Die Arylamidaseaktivität der Fraktion F 2 haftet wesentlich stärker an den Partikeln dieser Fraktion als die leicht ablösbare β -Glucuronidase. Eine mechanische Schädigung der Partikel kann also nicht zur Erklärung der Diskrepanz in der intrazellulären Verteilung der Arylamidase - und β - Glucuronidaseaktivität herangezogen werden. Die Frage, ob die Arylamidase ausschließlich wie die β - Glucuronidase in denselben Partikeln, d.h. Lysosomen, lokalisiert ist, wie es von MAHADEVAN und TAPPEL (20) an Leber - und Nierenpräparationen beschrieben wurde, ist aufgrund der unterschiedlichen Verhaltensweise von Arylamidase und β - Glucuronidase in der Fraktion F 2 gegen mechanische Schädigung (Kälteschockbehandlung) unwahrscheinlich. Diese Befunde sprechen eher dafür, daß es sich bei der Arylamidase in der Fraktion F 2 um überwiegend membrangebundene Enzymaktivitäten handelt, wie es EMMELOT (12) an Leberzellpräparationen beschrieben hat.

Tabelle 6

Überführung der in der Fraktion 2 partikelgebundenen
Enzyme in lösliche Formen¹⁾

Tier Nr.	Arylamidase	β - Glucuronidase
1	93	98
2	97	96
3	95	97
4	98	90
5	91	91
6	90	95
7	92	95
8	91	90
$\bar{x}$	93.4	94
S	2.9	3.2

¹⁾ Die in der Tabelle angegebenen Werte stellen Prozente der Enzymaktivität dar, die nach einstündiger Einwirkung von 5%igem Triton x 100 auf Proben der Fraktion F 2 und anschließender Zentrifugation bei $10^5 \times g$ in dem partikelfreien Überstand anzutreffen sind.

3.5. Vergleich der spezifischen Aktivität der Arylamidase in der Fraktion F 2 mit der Arylamidaseaktivität von Zellmembranpräparationen

Aus den in Kapitel 3.3. dargelegten Gründen wurde geprüft, inwieweit die Arylamidaseaktivität in der Fraktion F 2 auf zellmembrangebundene Aktivitäten zurückzuführen ist. Zellmembranpräparationen sind aus dem durch Differentialzentrifugation bei $1000 \times g$ anfallenden Rückstand von Alveolarmakrophagen - Homogenaten gewonnen worden (2.1.5.). Wie die Ergebnisse in der Tab. 7 zeigen, ist die spezifische Aktivität der Arylamidase in der Zellmembranfraktion 2 mal so hoch, wie in der Fraktion F 2. Zumindest ein Teil der in der Fraktion F 2 vorhandenen Enzymaktivität ist auf zellmembrangebundene Aktivitäten zurückzuführen.

3.6. Untersuchungen über die Eigenschaften der Arylamidaseaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen

Da die in der partikelfreien Fraktion F 4 vorliegende Aktivität nicht durch eine Schädigung der Partikel - zumindest nicht in der Gesamtheit - in diese Fraktion gelangen konnte, erhob sich die Frage, ob die in den einzelnen Zellfraktionen gefundenen Aktivitäten auf dasselbe Enzym zurückzuführen sind. Das L - Leucyl - β - Naphthylamid ist ein Substrat, welches auch in

Tabelle 7

Vergleich der spezifischen Aktivität¹⁾ zwischen der
Fraktion F 2 und der angereicherten Zellmembranfraktion

Tier Nr.	Fraktion F 2	Membranfraktion
6	21.4	40.2
7	21.5	45.7
8	12.5	27.3
$\bar{x}$	18.5	37.7

1) Die spezifische Aktivität ist als m μ Mol freigesetztes β - Naphthylamin pro Minute und mg Protein ausgedrückt.

Gegenwart der Leucinaminopeptidase gespalten wird. Arylamidaseaktivitäten können sich vor allem in rohen Präparaten mit den Leucinaminopeptidase - Aktivitäten überlappen (23,25,26), da beide in der Lage sind, die Spaltung desselben Substrates unter denselben Bedingungen zu katalysieren. Auf der anderen Seite kann man aus demselben Gewebe mehrere Protein - Fraktionen mit Arylamidaseaktivitäten extrahieren (27,29,22). Die Unterscheidung zwischen Leucinaminopeptidase und Arylamidase auf der einen Seite und zwischen verschiedenen Protein - Fraktionen mit Arylamidaseaktivitäten untereinander kann auch in rohen Präparaten anhand der pH - Optima, Hemmbarkeit oder Aktivierbarkeit durch Metallionen, SH - Gruppenreagenzien sowie durch Untersuchung des chromatographischen bzw. elektrophoretischen Verhaltens der Präparationen erfolgen. Aus diesem Grunde sollte der Einfluß des pH - Wertes, einiger in Frage kommender Metallionen und pCMB als SH - Gruppenreagenz auf die Arylamidaseaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen bestimmt werden. Anschließend sollte noch das elektrophoretische Verhalten der Arylamidaseaktivitäten geprüft werden. Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß die Zellkernfraktion F 1 je nach Präparation eine schwankende Menge noch nicht aufgebrochener Zellen enthielt, und eine weitere Homogenisierung zur Schädigung anderer Zellpartikel

führt - gemessen am Anstieg der β - Glucuronidaseaktivität in der Fraktion F 4 - ist bei den folgenden Versuchen auf diese Fraktion verzichtet worden. In erster Linie waren die Fraktionen F 2 und F 4 von Interesse, da hier die Hauptmenge etwa 80% der Aktivität anzutreffen war.

3.7. Untersuchung des Einflusses des pH - Wertes auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen

Zur Prüfung der Frage, ob zwei Enzyme identisch sind oder nicht, kann unter anderem das pH - Optimum als Kriterium herangezogen werden. Deshalb wurde der Einfluß des pH - Wertes auf die Arylamidaseaktivität in den interessierenden Zellfraktionen F 2 und F 4 untersucht. Während die Fraktionen F 2 kein deutliches pH - Optimum und eine sehr schwache Aktivitätsabhängigkeit in einem weiten pH - Bereich zeigt, sind in der Fraktion F 4 zwei deutliche pH - Optima bei pH 8,3 und 6,5 und eine starke Aktivitätsabhängigkeit vom pH - Wert festzustellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß zumindest zwei auf Grund ihrer pH - Optima unterscheidbare Enzyme - beide mit der Fähigkeit, die L - Leucyl - β - Naphthylamidspaltung zu katalysieren - in Alveolarmakrophagen von Kaninchen vorhanden sind (Abb. 3). Für hochgereinigte Leucinaminopeptidase aus Schweinenieren (30) sind zwei pH - Optima bei 9,1 und 9,3 gefunden worden.

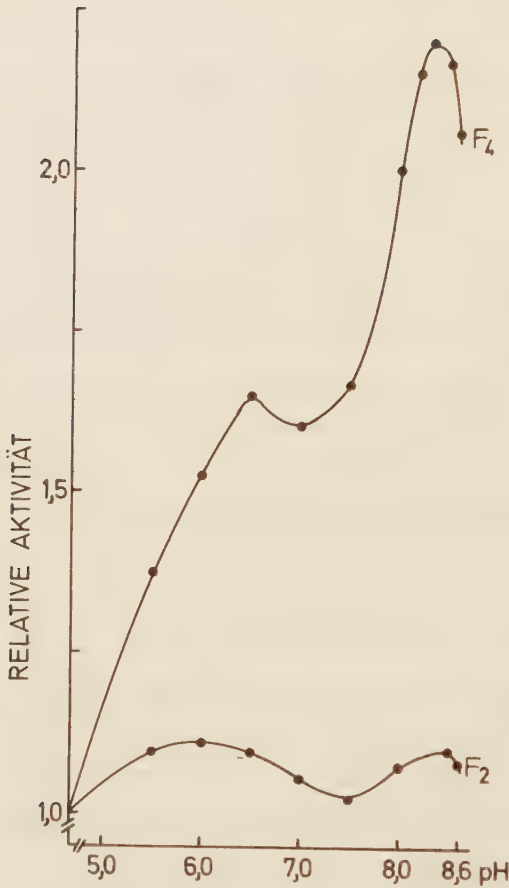


Abb. 3. Einfluß des pH - Wertes auf die Aktivität der Arylamidase in den Zellfraktionen F 2 und F 4. Die Enzymaktivitäten sind auf die Aktivitäten in den jeweiligen Fraktionen gemessen bei pH 5.2 = 1 bezogen. Die Inkubation erfolgte in 0.1m TRIS - Maleat - Puffer mit L - Leucyl - β -Naphthylamid als Substrat nach dem Standardverfahren (2.1.6.).

In Aszitestumorzellen von Mäusen liegt das pH - Optimum der Leucinaminopeptidase bei pH 8.2, während es nach HASCHEN (31) im Serum bei pH 8.0 liegt. Das im partikelfreien Überstand befindliche Enzym könnte aufgrund seines im schwach Alkalischen liegenden pH - Optimums ein mit der Leucinaminopeptidase identisches oder ähnliches Enzym sein. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wird anhand anderer Kriterien im weiteren in dieser Arbeit zu prüfen sein. DIENSTL et.al. (10) untersuchten die Spaltung von L - Leucyl - β - Naphthylamid durch Leukozyten. Die Untersuchungen sind an Zytolysaten von normalen Granulozyten, Zellen von chronischen Myelosen und Lymphadenosen des Menschen und in Peritonealmakrophagen von Meerschweinchen durchgeführt worden. In den erstgenannten drei Zellarten fanden die Autoren ein pH - Optimum von pH 7.1. Da in dieser Arbeit keine Angaben über das pH - Optimum der Aktivität in Meerschweinchen - Peritonealmakrophagen zu finden sind, ist ein Vergleich mit den hier gefundenen Werten nicht möglich. Außerdem dürfte es sich auch dann um eine Summenkurve mindestens zweier Enzyme handeln. Die Fraktion F 2 hat eine ähnliche pH - Abhängigkeit wie es PATTERSON et.al. (23) in einer aktiven Proteinfraction aus Mäuse - Aszitestumorzellen beschrieben haben. Dagegen scheint diese Fraktion aufgrund ihrer pH - Aktivitätskurven von den von MAHADEVAN und TAPPEL (20) beschriebenen lysosomalen bzw.

mikrosomalen Arylamidaseaktivitäten aus Leber und Niere von Ratten verschieden zu sein.

3.8. Untersuchung des Einflusses von Metallionen auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen
Für die meisten Peptidasen ist das Verhalten gegenüber Metallionen charakteristisch. Gereinigte Leucinamino-peptidase wird durch Mn^{++} - Ionen aktiviert (23, 30). Enzyme hingegen, die ebenfalls L - Leucyl - β Naphthylamid hydrolysieren, jedoch mit der Leucinaminopeptidase nicht identisch sind, werden durch Mn^{++} - Ionen nicht beeinflusst (32) oder gehemmt (33.34). Die in der lysosomalen Fraktion von Leber und Niere lokalisierte Arylamidaseaktivität wurde durch Cu^{++} - und Co^{++} - Ionen gehemmt (20).

Um die Arylamidaseaktivität in den entsprechenden Zellfraktionen der Alveolarmakrophagen weiter zu charakterisieren wurde der Einfluß von Mn^{++} -, Cu^{++} - und Co^{++} - Ionen auf die Enzymaktivität untersucht. Da die Fraktion F 2 durch die Fraktion F 4 verunreinigt sein könnte, ist ein aliquoter Teil der Fraktion F 2 nach der 5maligen Kältebehandlung durch Zentrifugation bei $10^5 \times g$ in einen - unter diesen Bedingungen - partikelgebundenen (F 2 P) und einen löslichen Anteil (F 2 L) getrennt worden (2.1.4.). Um zu prüfen, bei welchen Konzentrationen der betreffenden Metallionen die Arylamidase-

aktivität beeinflusst wird bzw. um die optimale Metallionenkonzentration zu erhalten bei welcher eine Unterscheidung der unter Umständen nicht identischen Enzyme in den einzelnen Zellfraktionen möglich ist, sind zunächst in Vorversuchen die interessierenden Zellfraktionen unter Standardbedingungen (2.1.4.) in Gegenwart und Abwesenheit von Cu^{++} - , Co^{++} - und Mn^{++} - Ionen bei steigender Ionenkonzentration inkubiert worden.

3.9. Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Metallionenkonzentrationen auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen

Um die optimalen Bedingungen für den Einfluß der Metallionen auf die Enzymaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen zu ermitteln, wurde der Einfluß unterschiedlicher Metallionenkonzentrationen bzw. der Einfluß einer Präinkubation der Metallionen mit dem betreffenden Zellfraktionen untersucht.

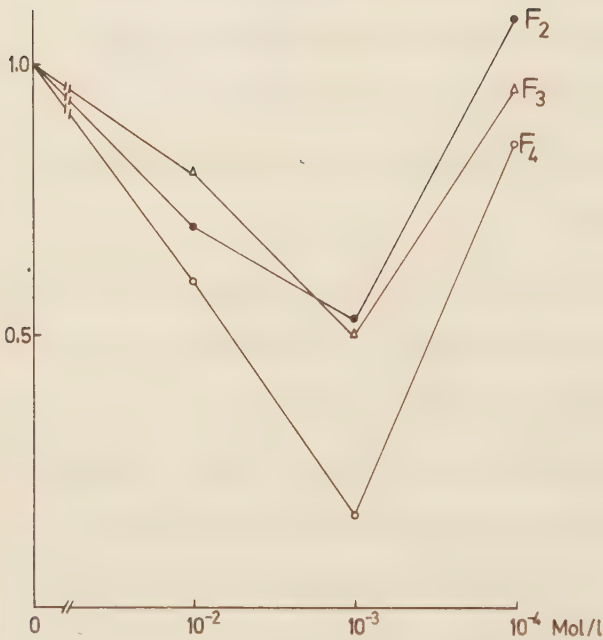


Abb. 4. Einfluß unterschiedlicher Cu^{++} - Ionenkonzentrationen auf die Arylamidaseaktivität in den Fraktionen F 2, F 3 und F 4. Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Cu^{++} - Ionenzusatz = 1 bezogen. Inkubation in 0,1 m TRIS - Puffer pH 7.2 mit L - Leucyl - β - Naphthylamid als Substrat (2.1.8.).

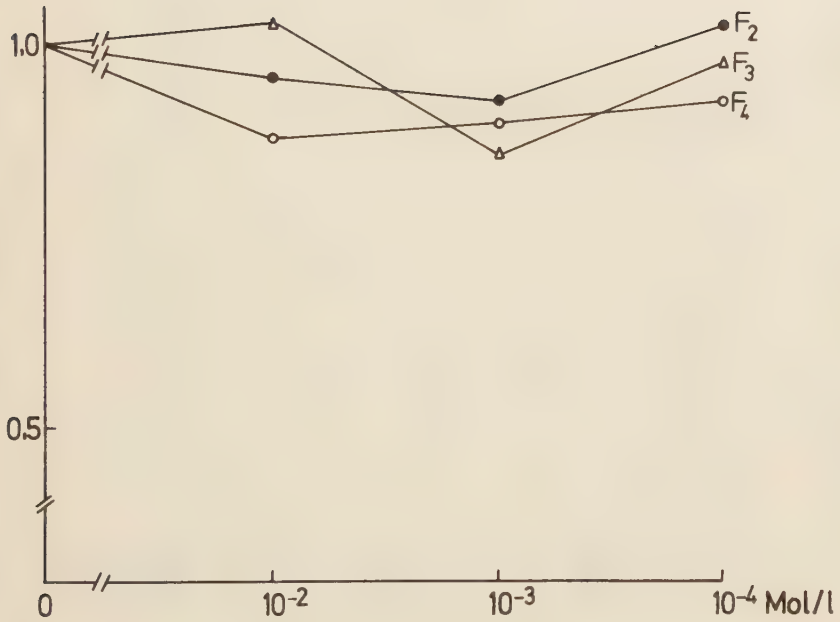


Abb. 5. Einfluß unterschiedlicher Co^{++} - Ionenkonzentrationen auf die Arylamidaseaktivität in den Fraktionen F 2, F 3 und F 4. Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Co^{++} - Ionenzusatz = 1 bezogen. Inkubation in 0.1 m TRIS - Puffer pH 7.2 mit L - Leucyl - β - Naphthylamid als Substrat (2.1.8.).

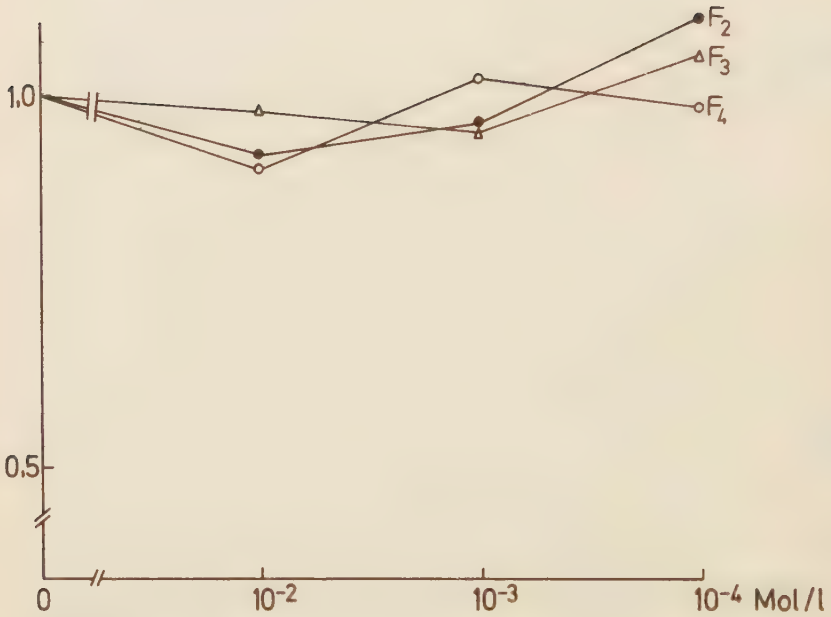


Abb. 6. Einfluß unterschiedlicher Mn^{++} - Ionenkonzentrationen auf die Arylamidaseaktivität in den Fraktionen F 2, F 3 und F 4. Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Mn^{++} - Ionenzusatz = 1 bezogen. Inkubation in 0.1 m TRIS - Puffer pH 7.2 mit L - Leucyl - β - Naphthylamid als Substrat (2.1.8.).

Tabelle 8

Untersuchung des Einflusses der Präinkubation der einzelnen Zellfraktionen mit Metallionen auf die Arylamidaseaktivität¹⁾

Zellfraktion	F 2	F 3	F 4
Präinkubation	+	+	+
Cu ⁺⁺ 10 ⁻³ Mol/l	58	53	22
Co ⁺⁺ 10 ⁻³ Mol/l	85	91	89
Mn ⁺⁺ 10 ⁻³ Mol/l	98	100	100

1) Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Metallionenzusatz = 100 bezogen. Inkubation in 0.1 m TRIS - Puffer pH 7.2 mit L - Leucyl - β - Naphthylamid als Substrat (2.1.8.)

Tabelle 9

Untersuchung des Einflusses von Cu^{++} Ionen (10^{-3} Mol/l) auf die Spaltung von L - Leucyl - β - Naphthylamid durch die Zellfraktionen

Tier Nr.	Fraktionen				
	F 2	F 2 P	F 2 L	F 3	F 4
1	70	66	58	56	15
2	51	55	33	63	16
3	62	60	26	48	30
4	70	38	20	44	18
5	46	53	20	43	13
6	32	37	45	55	5
7	43	48	38	50	14
8	47	52	24	62	23
$\bar{x}$	52.6	51.1	33.0	52.6	16.8
S	13.6	10.0	13.4	7.6	7.4

Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Cu^{++} - Ionenzusatz = 100 bezogen (2.1.8.)

Tabelle 10

Untersuchung des Einflusses von Co^{++} - Ionen (10^{-3} Mol/l) auf die Spaltung von L - Leucyl - β - Naphthylamid durch die Zellfraktionen

Tier Nr.	Fraktionen				
	F 2	F 2 P	F 2 L	F 3	F 4
1	103	93	94	100	87
2	100	94	80	92	88
3	86	90	89	103	97
4	77	97	83	94	82
5	88	96	89	91	81
6	90	90	85	87	90
7	90	88	82	97	88
8	93	98	89	103	83
$\bar{x}$	90.9	93.3	86.4	95.9	86.9
S	8.1	3.7	4.7	5.9	5.3

Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Co^{++} - Ionensatz = 100 bezogen (2.1.8.)

Tabelle 11

Untersuchung des Einflusses von Mn^{++} - Ionen (10^{-3} Mol/l) auf die Spaltung von L - Leucyl - β - Naphthylamid durch die Zellfraktionen

Tier Nr.	Fraktionen						
	F 2	F 2 P	F 2 L	F 3	F 4		
1	117	99	102	101	100		
2	99	96	103	100	92		
3	93	98	93	100	103		
4	94	100	99	92	106		
5	97	103	90	94	99		
6	98	100	93	95	83		
7	100	95	101	91	90		
8	99	98	98	95	98		
$\bar{x}$	99.6	98.6	97.4	96.0	96.4		
S	7.4	2.5	4.8	3.9	7.5		

Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Mn^{++} - Ionenzusatz = 100 bezogen (2.1.8.)

Wie in Kapitel 3.6. beschrieben wurde, stand die Frage offen, ob die in der Fraktion F 4 gefundene Aktivität vielleicht mit einer Leucinaminopeptidase identisch oder ähnlich ist. Die Aktivierungsversuche mit Mn^{++} - Ionen zeigen jedoch, daß die Aktivität in dieser Fraktion nicht mit der beschriebenen Leucinaminopeptidase identisch sein kann. Während Leucinaminopeptidase durch Mn^{++} - Ionen stark aktiviert wird, wird die Fraktion F 4 von Mn^{++} - Ionen nicht wesentlich beeinflusst.

Auch ein Vergleich unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen von MAHADEVAN und TAPPEL (20) zeigt, daß die von ihnen in Leber und Nierenzellfraktionen beschriebenen Arylamidasen im Vergleich zu der hier beschriebenen Arylamidaseaktivität in den entsprechenden Zellfraktionen wesentliche Unterschiede aufweisen. Mn^{++} - Ionen hemmen bis auf 62% bzw. auf 33% in der lysosomalen -, aktivieren auf 256% bzw. 200% in der mikrosomalen - und auf 409 bzw. 254% in der partikelfreien Überstand - Fraktion von Leber - bzw. Nierengewebe (20). Keine Makrophagenfraktion wurde durch Mn^{++} - Ionen gehemmt und es ergaben sich auch zwischen den einzelnen Zellfraktionen keine Unterschiede in ihrem Verhalten gegen Mn^{++} - Ionen. Cu^{++} - Ionen aktivierten in den

mikrosomalen Fraktionen, hemmten stark die lysosomale Fraktion und die partikelfreie Überstand - Fraktion von Leber - und Nierengewebe (20). In den Makrophagenfraktionen hingegen wurden alle untersuchten Fraktionen gehemmt. Ein signifikanter Unterschied ergab sich dabei zwischen der Fraktion F 2 und F 4. In der partikelfreien Überstand - Fraktion F 4 wird die Aktivität bis auf 16,8%, in der mitochondrial - lysosomalen Fraktion F 2 hingegen bis auf 51.1% der ursprünglichen Aktivität gehemmt.

Co^{++} - Ionen übten auf die Aktivität in keiner der untersuchten Makrophagenfraktionen einen wesentlichen Einfluß aus. Lediglich die Fraktion F 4 wurde - jedoch nur geringfügig - bis auf 86.9% stärker gehemmt als die übrigen Fraktionen.

Die partikelfreie Überstand - Fraktion wird nach MAHADEVAN und TAPPEL auf 625 bzw. 707%, die mikrosomale Fraktion auf 300 bzw. 224%, die lysosomale Fraktion auf 58 bzw. 24% in Leber - und Nierenpräparationen aktiviert bzw. gehemmt (20). Die Autoren arbeiteten in einem TRIS - Maleat - Puffer pH 6,0, bei einer Substratkonzentration von 1.36×10^{-3} Mol/l und mit Präinkubation der Zellfraktionen mit den entsprechenden Metallionen.

Die in den Tabellen 9, 10 und 11 angeführten Werte sind in TRIS - Maleat - Puffer pH 7.2 und einer Metallionenkonzentration von 10^{-3} Mol/l erhalten worden. In Vorversuchen wurde geklärt, daß die Aktivitätswerte für Makrophagenzellfraktionen in TRIS - Puffer von dem in TRIS - Maleat - Puffer erhaltenen nicht unterschiedlich sind. Aus dem Vergleich dieser Werte kann man deshalb entnehmen, daß in den Zellfraktionen der Alveolarmakrophagen von Kaninchen vorhandenen Enzymaktivitäten in ihrem Verhalten gegenüber Metallionen andere Eigenschaften zeigen als bisher beschriebene Arylamidase - oder Leucinaminopeptidase - Aktivitäten. Weiterhin zeigt sich, daß wie in den pH - Aktivitätskurven zwischen der Fraktion F 2 bzw. F 3 auf der einen Seite und der Fraktion F 4 auf der anderen Seite auch Unterschiede in dem Verhalten dieser Fraktionen gegenüber Metallionen auftreten. Änderungen des pH - Wertes des Inkubationsmediums (6.0 - 7.2) bzw. der Metallionenkonzentration zwischen 10^{-4} bis 10^{-2} Mol/l hatten keinen prinzipiellen Einfluß auf die Ergebnisse.

3.10 Untersuchung des Einflusses von pCMB auf die Aktivität in den einzelnen Zellfraktionen:

Um zwei ähnliche Enzyme voneinander zu unterscheiden, kann man von der Möglichkeit Gebrauch machen, SH-Gruppen, die in dem Enzymprotein vorhanden sind, durch

eine mit dieser Gruppe reagierende Substanz, umzusetzen und zu blockieren. Eine der am meisten verwendeten Substanzen ist dabei pCMB. Enzymproteine, bei denen die SH-Gruppen für die Aktivität essentiell sind, werden durch pCMB gehemmt, während Enzyme, für die freie SH-Gruppen nicht essentiell sind, nicht beeinflusst werden.

Nach SMITH et.al. (22) hemmt pCMB die Arylamidaseaktivität in Leberpräparationen des Menschen. FELGENHAUER und GLENNER (14) berichteten, daß in Rattennieren zwei Arylamidasen vorhanden sind: eine partikelgebundene und eine lösliche Arylamidase. Die zwei Arylamidasen zeigten ein unterschiedliches Verhalten gegenüber pCMB. Das lösliche Enzym wurde durch 10^{-4} m pCMB total gehemmt, während die partikelgebundene Enzymaktivität durch pCMB nicht beeinflusst wurde. Nach MAHADEVAN und TAPPEL (20) hemmt 2×10^{-4} m pCMB die Arylamidaseaktivität sowohl in Rattenleberhomogenaten als auch in allen Leberzellfraktionen, während in Rattennierenhomogenaten nur eine partielle Hemmung in der mitochondrialen Fraktion und im partikelfreien Überstand auftrat. Eine vollständige Hemmung war nur in der lysosomalen Fraktion zu erzielen. MAHADEVAN und TAPPEL (20) nehmen deshalb an, daß das von FELGENHAUER und GLENNER (14) beschriebene Enzym aus Rattennieren lysosomalen Ursprungs ist.

Tabelle 12

Untersuchung des Einflusses von pCMB (10^{-4} Mol/l) auf die Spaltung von L - Leucyl - β - Naphthylamid durch die Zellfraktionen

Tier Nr.	Fraktionen						
	F 2	F 2 P	F 2 L	F 3	F 4		
1	116	104	93	99	48		
2	88	101	66	96	45		
3	94	105	83	73	29		
4	100	111	81	94	36		
5	97	101	71	91	27		
6	92	98	78	92	27		
7	101	96	68	88	39		
8	102	105	65	99	41		
$\bar{x}$	98.8	102.5	75.6	91.5	36.5		
S	8.5	4.4	9.8	8.4	8.2		

Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne pCMB - Zusatz = 100 bezogen (2.1.8.)

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, wird durch pCMB die Arylamidaseaktivität in der Fraktion F 4, d. h. in dem von Zellpartikeln befreiten Überstand, bis auf 36,5% gehemmt. In anderen Zellfraktionen ist keine Hemmung festzustellen. Es ist nicht auszuschließen, daß die Fraktion F 4 noch verunreinigt ist und deshalb keine vollständige Hemmung durch pCMB zustande gekommen ist. Die in der Fraktion F 2 vorhandene Aktivität bleibt in Übereinstimmung mit den von FELGENHAUER und GLENNER (14) an Rattennieren erhobenen Befunden und im Gegensatz zu MAHADEVAN und TAPPEL (20) durch pCMB unbeeinflusst. Dieser Befund stützt die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Ergebnisse, wonach in Alveolarmakrophagen mindestens zwei voneinander verschiedene und unterschiedlich lokalisierte Enzyme mit Arylamidaseaktivität vorhanden sind. Das in dem partikelfreien Überstand lokalisierte Enzym besitzt für die Aktivität eine essentielle SH-Gruppe/oder Gruppen, während das vorwiegend an Partikeln haftende Enzym keine für die Aktivität essentiellen SH-Gruppen besitzt.

3.11. Untersuchungen des Einflusses von Methionin auf die Enzymaktivität in den einzelnen Zellfraktionen

Eine weitere Möglichkeit, um distinkte Enzyme, die die Spaltung von L - Leucyl - β - Naphthylamid katalysieren, voneinander zu unterscheiden, besteht in der Untersuchung des Einflusses von Methionin auf die Enzymaktivitäten. Nach SMITH und RUTENBURG (35) und nach FLEISHER und Mitarbeitern (36) werden die im Serum vorkommenden Arylamidasen durch 0.01 m Methionin partiell gehemmt. Wie Untersuchungen in Gewebshomogenaten gezeigt haben, verhalten sich Arylamidaseaktivitäten im Gegensatz zu den Serumenzymen und von Gewebe zu Gewebe recht unterschiedlich. Sie werden gehemmt, aktiviert oder nicht beeinflusst (35). Um die Arylamidaseaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen von Makrophagen weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluß von Methionin auf die Arylamidaseaktivität untersucht.

Nachdem in Vorversuchen ermittelt wurde, daß in TRIS - Maleat - Puffer pH 6.0 die Unterschiede in dem Einfluß von Methionin auf die Enzymaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen zwar gleichsinnig aber größer waren als in TRIS - Puffer pH 7.2 oder pH 6.0, wurden in den Versuchsansätzen die Inkubationen in diesem Puffer durchgeführt. Wie aus der Tab. 13 ersichtlich ist,

Tabelle 13

Untersuchung des Einflusses von Methionin (10^{-2} Mol/l) auf die Spaltung von L - Leucyl - β - Naphthylamid durch die Zellfraktionen

Tier Nr.	Fraktionen				
	F 2	F 2 P	F 2 L	F 3	F 4
1	54	37	76	64	94
2	14	38	52	25	88
3	30	28	75	43	79
4	19	19	36	39	80
5	33	26	56	30	71
6	22	26	48	48	83
7	38	34	62	53	86
8	35	42	34	34	74
$\bar{x}$	30.6	31.3	54.9	42.0	81.9
s	12.6	7.7	15.8	12.8	7.5

Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion ohne Methionin - Zusatz = 100 bezogen (2. 1. 9.)

bestehen auch hier Unterschiede zwischen der Fraktion F 2 und F 4, während die Fraktion F 3 in ihrem Verhalten mehr der Fraktion F 2 ähnelt. Die Fraktion F 2 wird durch Methionin verglichen mit Kontrollwerten ohne Methioninzusatz bis auf 30.6% der ursprünglichen Aktivität gehemmt, während ein entsprechender Vergleich der Fraktion F 4 lediglich eine Hemmung bis auf 81.3% aufweist. Wie alle in vorangegangenen Kapiteln geschilderten Untersuchungen zeigen, sind die Unterschiede zwischen den Fraktionen F 2 und F 4 die eklatantesten. Wahrscheinlich ist die Fraktion F 2 immer etwas mit Fraktion F 4 verunreinigt. Das in der Fraktion F 2 vorkommende Enzym wird stärker durch Methionin gehemmt als das in dem partikelfreien Überstand lokalisierte Enzym. Damit ist ein weiterer Anhaltspunkt aufgezeigt, daß in Alveolarmakrophagen von Kaninchen mindestens zwei unterschiedlich lokalisierte Enzyme mit Arylamidaseaktivität vorkommen.

3.12. Untersuchung der enzymkatalysierten Spaltung verschiedener Aminosäure - β - Naphthylamide durch die Fraktionen F 2 und F 4

In den vorangegangenen Kapiteln sind eine Reihe von Anhaltspunkten beschrieben worden, die dafür sprechen, daß in den Makrophagen zumindest zwei und unterschiedlich lokalisierte Enzyme mit Arylamidaseaktivität vorkommen. Sind diese Enzyme wirklich nicht identisch, so ist zu erwarten, daß sie auch in ihrer Substratspezifität Unterschiede aufweisen. Aus diesem Grunde sollte der Versuch unternommen werden, die Substratspezifität dieser Makrophagenfraktionen miteinander zu vergleichen. Als Substrat dienten dabei sechs verschiedene Aminosäure - Naphthylamide. Da die Arylamidaseaktivität hauptsächlich in der Fraktion F 2 und der partikelfreien Überstand - Fraktion F 4 dieser Zellen vorkommt, wurden die Untersuchungen nur mit diesen Fraktionen durchgeführt.

Wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich ist (Tab. 14), bestehen Unterschiede in der Umsatzrate verschiedener Aminosäure - Naphthylamide zwischen den Fraktionen F 2 und F 4. L - Phenylalanyl - β - Naphthylamid, L - Cystyl - di - β - Naphthylamid und vor allem L - Lysyl - β - Naphthylamid werden wesentlich schneller von der Fraktion F 4, L - Tyrosyl - β - Naphthylamid

Tabelle 14

Untersuchung der entzymkatalysierten Spaltung verschiedener Aminosäure - β - Naphthylamide durch die Fraktionen F 2 und F 4

Substrat	L-Phenylalanyl- β -NA		L-Thyrosyl- β -NA		L-Lysyl- β -NA		N-Benzoyl-d,l-Arginyl- β -NA		L-Cystyl-di- β -NA	
Tier Nr.	F 2	F 4	F 2	F 4	F 2	F 4	F 2	F 4	F 2	F 4
1	69	108	80	50	37	176	2	11	6	28
2	72	107	77	36	42	146	7	7	8	19
3	67	99	78	32	41	116	2	5	4	41
4	77	77	94	54	36	135	1	7	8	39
5	70	88	85	38	39	123	5	3	11	27
6	72	105	90	51	33	183	1	2	9	40
7	68	96	92	37	45	145	3	1	5	37
8	71	97	82	32	31	150	7	6	7	29
$\bar{x}$	70.8	97.1	84.8	41.3	38.0	146.8	3.5	5.3	7.3	32.5
S	3.1	10.5	6.6	8.9	4.7	23.4	2.5	3.2	2.3	7.9

Die Aktivitäten sind auf die Aktivität des Enzyms in der betreffenden Zellfraktion mit L - Leucyl - β - Naphthylamid als Substrat = 100 bezogen (2.1.10.)

von der Fraktion F 2 umgesetzt. N - Benzoyl - d, 1 - Arginyl - β - Naphthylamid wird dagegen von beiden Fraktionen sehr schwach umgesetzt. Hier bestehen auch zwischen den beiden Fraktionen keine Unterschiede in der Umsatzgeschwindigkeit. Diese Ergebnisse stützen alle bisher geschilderten Untersuchungen in der Richtung, daß Alveolarmakrophagen von Kaninchen zwei distinkte Arylamidasen enthalten. Weiterhin zeigt sich anhand dieser Peptidmodelle, daß zumindest nicht alle Peptidbindungen in Makrophagen gespalten werden können und daß auch die Peptidbindungen, die gespalten werden, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden. Es ist durchaus denkbar, daß die enzymatische Ausstattung dieser Zellen für die Immunogenität einer Substanz mit von Bedeutung sein kann.

3.13. Elektrophoretische Trennung der Arylamidaseaktivitäten auf Acrylamidgel

Es sind eine Reihe von Serumproteinfraktionen mit Arylamidaseaktivität elektrophoretisch u. a. im menschlichen Serum (37) und in einer Reihe von Gewebesextrakten (35) nachgewiesen worden.

FELGENHAUER und GLENNER (14) haben aus Rattennieren discelektrophoretisch 3 Arylamidasen nachweisen können. Eine davon war ein Lyo-Enzym und die beiden anderen

Desmo-Isoenzyme. Um die Arylamidaseaktivitäten in den Makrophagen weiter zu charakterisieren ist das elektrophoretische Verhalten der Arylamidaseaktivitäten in der Fraktion F 2 und F 4 auf Acrylamidgel untersucht worden.

Wie aus der Photographie des Pherogramms (Abb. 7) ersichtlich ist, sind unter den angegebenen Versuchsbedingungen in der Fraktion F 2 vier Banden nachweisbar. Die dominierende Bande 2 kommt ausschließlich in dieser Fraktion vor, während die schwache Bande 1 und die starken Banden 3 und 4 auch in der Fraktion F 4 nachweisbar sind. Die Bande 5 kommt ausschließlich in der Fraktion F 4 vor. Die in der Fraktion F 2 lokalisierte Bande 2 ist ein stark an Partikeln (wahrscheinlich Zellmembranen) haftendes Enzym, das erst nach Behandlung dieser Fraktion mit Triton x 100 in Lösung geht. Proben dieser Fraktion ohne vorherige Behandlung mit diesem Detergenz zeigten eine starke Bande an der Auftragstelle und die Bande 2 fehlte völlig. Bei Triton x 100 vorbehandelten Proben dagegen ist keine Enzymaktivität an der Auftragstelle nachweisbar und die dominierende Bande 2 erscheint. Diese diselektrophoretischen Befunde bestätigen die in den vorangegangenen Kapiteln geschilderten Ergebnisse, die gezeigt haben, daß die unterschiedlich

lokalisierten Arylamidaseaktivitäten in Makrophagen nicht auf ein einheitliches Enzym zurückzuführen sind. Zusätzlich zeigen diese Untersuchungen, daß beide Zellfraktionen ein Gemisch sowohl elektrophoretisch distinkter als auch identischer Enzyme enthalten.

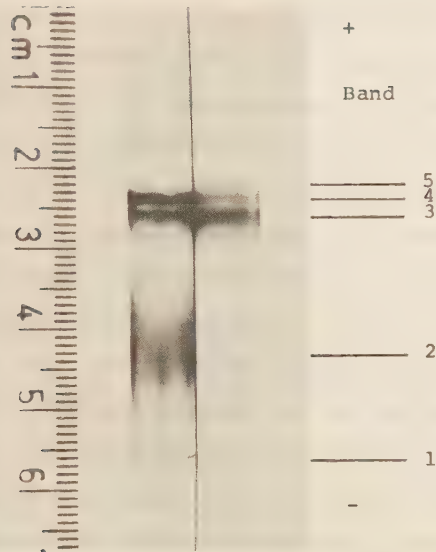


Abb. 7. Elektrophoretische Trennung und Nachweis von Arylamidase-Isoenzymen in der Fraktion F 2 und in dem von Partikeln befreiten Überstand (Fraktion F 4) der Alveolarmakrophagen. Aufgetragen wurden 200 μ g der Fraktion F 2 bzw. F 4 nach Vorbehandlung der Proben mit 5% Triton x 100. Die Elektrophorese erfolgte auf 7%igem Polyacrylamidgel 70 Minuten bei 4°C in 0.05 m Glycin-Puffer bei pH 8.6. Nachweis der Enzymaktivität nach FELGENHAUER und GLENNER (14) mit L-Leucyl- β -Naphthylamid als Substrat (2.1.11.).

4. Zusammenfassung

Untersuchungen an BCG - induzierten Alveolarmakrophagen von Kaninchen zeigten, daß 60.8% der Arylamidaseaktivität unter den angegebenen Versuchsbedingungen in der die Mitochondrien, Lysosomen und Zellmembranen enthaltenden Fraktion F 2 und 27.6% in der partikelfreien Cytoplasma - Fraktion F 4 lokalisiert sind. In der mikrosomalen Fraktion F 3 ist eine geringfügige Aktivität von 2.5% anzutreffen, wobei es fraglich ist, ob diese Aktivität nicht nur eine Verunreinigung aus den erstgenannten Fraktionen darstellt (Tab. 3.). Die Fraktion F 1, die die Kernfraktion repräsentieren soll, enthält ebenfalls Arylamidaseaktivitäten, die wie aus der Tab. 3 hervorgeht, eine starke Variation aufweist. Dies ist nicht verwunderlich, denn diese Fraktion enthielt immer noch recht unterschiedliche Mengen mikroskopisch intakt erscheinender Zellen. Da in erster Linie die Fraktion F 2 von Interesse war, und diese nach längerer Homogenisation - diese Behandlung wäre nötig gewesen, um alle Zellen aufzuschließen - beschädigt wurde (β - Glucuronidase - ein lysosomales Leitenzym - erschien in der cytoplasmatischen Fraktion), mußte auf die nähere Untersuchung der Arylamidaseaktivitäten in der Kernfraktion verzichtet werden. Es steht also offen, ob Arylamidaseaktivität in den Zellkernen

von Makrophagen vorkommt oder nicht. Alveolarmakrophagen enthalten im Vergleich zu Peritonealmakrophagen erhöhte Arylamidaseaktivitäten (Tab. 1.). COHN und WIENER (6,7) fanden ebenfalls, daß lysosomale Enzyme wie β - Glucuronidase, saure Phosphatase, Kathepsin, Lysozym, saure Ribonuklease, Esterase und Lipase in BCG - induzierten Alveolarmakrophagen gegenüber Peritonealmakrophagen erhöht sind. Die erhöhte Arylamidaseaktivität und die erhöhte Aktivität der vorhin aufgeführten Enzyme gegenüber Peritonealmakrophagen läßt grundsätzlich zwei Deutungen dieser Befunde zu. Entweder sind Peritoneal- und Alveolarmakrophagen verschiedenen Ursprungs und unterschiedlicher Enzymausstattung oder was aufgrund der Versuche von COHN (38,39) wahrscheinlicher ist, es handelt sich um den Ausdruck unterschiedlicher Funktionszustände der Zellen. COHN (38,39) stellte fest, daß in Zellkulturen von Makrophagen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit es zur Zunahme der Aktivität lysosomal lokalisierter Enzyme kam. Sie deuteten diese Ergebnisse als Aktivierung oder erhöhte Neusynthese dieser Enzyme als Folge des veränderten Funktionszustandes der Zellen.

Da der Hauptanteil der Arylamidaseaktivität in den Fraktionen F 2 und F 4 vorzufinden war (Tab. 3) sind die Untersuchungen auf diese beiden Fraktionen

beschränkt worden. Es lag zunächst die Vermutung nahe, daß die in den Fraktionen F 2 vorkommenden Enzyme ähnlich wie MAHADEVAN und TAPPEL (20) es in Nieren und Leberpräparationen beschrieben haben, in Lysosomen lokalisiert sind.

Verschiedene lysosomale Enzyme verhalten sich gegen mechanische Beanspruchung der Lysosomenmembran unterschiedlich. Während ein lysosomales Leitenzym wie β - Glucuronidase leicht in Lösung geht wie aus den Untersuchungen (Tab. 5) hervorgeht, ist Arylamidase verglichen mit β - Glucuronidase ein stark an Partikeln haftendes Enzym. Durch Kälteschockbehandlung (Tab. 5) ist lediglich 12.3% der Arylamidaseaktivität in Lösung gegangen, während bei derselben Präparation 74.9% der β - Glucuronidaseaktivität in Lösung ging.

Die höchste spezifische Aktivität ließ sich in der Zellmembranpräparation nachweisen (Tab. 7). Demnach ist die Arylamidase in der Fraktion F 2 zumindest zum Teil zellmembrangebunden und kein ausschließlich lysosomal lokalisiertes Enzym. Die in der Fraktion F 2 und F 4 vorhandene Arylamidaseaktivität weist Unterschiede im Hinblick auf ihr pH - Optimum (Abb. 3), ihre Hemmbarkeit durch Metallionen (Abb. 4,5,6) , pCMB (Tab. 12), Methionin (Tab. 13) und Substratspezifität (Tab. 14) auf. Durch Elektrophorese auf

Acrylamidgel (Abb. 7) lassen sich 5 Banden mit Arylamidaseaktivitäten nachweisen. Bande 2 kommt nur in der Fraktion F 2 vor und ist mit dem zellmembrangebundenen Enzym wahrscheinlich identisch. Beide Fraktionen enthalten elektrophoretisch heterogene Arylamidaseaktivitäten.

5. Literaturverzeichnis

1. ASKONAS, B.A., : Immunogenicity of Antigen-Con-
RHODES, J.M. taining Ribonucleic Acid Prepa-
rations from Macrophages.
Nature 205: 470 (1965)
2. GALLILY, R., : The Role of Macrophages in the
FELDMAN, M. Induction of Antibody in X-Irra-
diated Animals. Immunology 19:
12 (1967)
3. FISHMAN, M., : In Vitro Transfer of Macrophage
BOND, V.P., RNA to Lymph Node Cells. Nature
HAMMERSTROM, R.A. 192: 549 (1963)
4. MITCHELL, G.F., : Cell to Cell Interaction in the
MILLER, J.F.A.P. Immune Response. II. The Source
of Hemolysin-Forming Cells in
Irradiated Mice Given Bone Marrow
and Thymus or Thoracic Duct
Lymphocytes. J. Exp. Med. 128:
821 (1968)
5. NELSON, D.S. : Macrophages and Immunity. North-
Holland Publishing Company Amster-
dam-London (1969) p.20
6. COHN, Z.A., : The Particulate Hydrolases of
WIENER, E. Macrophages I. Comparative En-
zymology, Isolation and Proper-
ties. J.Exp.Med. 118:991(1963)
7. COHN, Z.A., : The Particulate Hydrolases of
WIENER, E. Macrophages II. Biochemical and
Morphological Response to Particle
Ingestion. J. Exp. Med. 118:
1009 (1963)
8. MYRVIK, O.U.N., : Lysozyme Content of Alveolar and
SOTO LEAKE, E., Peritoneal Macrophages from the
FARISS, B. Rabbit. J.Immunol. 36:133 (1961)

9. MYRVIK, O.U.N., : A Study of Macrophages and
SOTO LEAKE, E., Epithelioid-Like Cells from Gra-
OSHIMA, S. nulomatous BCG-Induced Lungs of
Rabbits. J. Immunol. 89: 745 (1962)
10. DIENSTL, F., : Spaltung von L-Leucyl- β -Naphthyl-
SAILER, S., amid HCl durch Leukozyten. Klin.
SANDHOFER, F., Wschr. 42. Jahrg.: 794 (1964)
BRAUNSTEINER, H.
11. GLENNER, G.G., : Comparative Observations on Histo-
MEYER, D.B., chemical Techniques for Amino-
BURSTONE, M.S. peptidase. J. Histochem. Cytochem.
7: 297 (1959)
12. EMMELOT, P., : Studies of Plasma Membranes. I.
BOS, C.J., Chemical Composition and Enzyme
BENEDETTI, E.L., Content of Plasma Membranes Isola-
RÜMKE, PH. ted from Rat Liver. Biochim. Bio-
phys. Acta 90: 126 (1964)
13. ARNOLD, D. : Persönliche Mitteilung, Institut
für Physiologische Chemie der
Freien Universität Berlin
14. FELGENHAUER, K., : The Enzymatic Hydrolysis of Amino
GLENNER, G.G. Acid-Naphthylamides. II. Partial
Purification and Properties of a
Particle-Bound Cobalt-Activated
Rat Kidney Aminopeptidase. J. Histo-
chem. Cytochem. 14: 401 (1966)
15. LAYNE, E. : in: Methods in Enzymology. Editors:
Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.,
Academic Press Inc., Publishers
New York (1957) p.447
16. FISHMAN, W.H. : in: Methoden der Enzymatischen
Analyse von Bergmeyer, H.U.,
Verlag Chemie GmbH (1962) S.869

17. DAVIS, B.J. : Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404 (1964)
18. BURSTONE, M.S., : Histochemical Demonstration of
FOLK, J.E. Aminopeptidase. J. Histochem. Cytochem. 4: 217 (1956)
19. SYLVEN, B., : The Suggested Lysosomal Local-
LIPPI, U. sation of Aminoacyl-Naphthylamide Splitting Enzymes. Exp. Cell Res. 40: 145 (1965)
20. MAHADEVAN, S., : Arylamidases of Rat Liver and
TAPPEL, A.L. Kidney. J. Biol. Chem. 242: 2369 (1967)
21. SYLVEN, B., : Studies on the Histochemical
BOIS-SVENSSON, I. "Leucine Aminopeptidase" Reaction IV. Chemical and Histochemical Characterization of the Intracellular and Stromal LNA Reactions in Solid Tumor Transplants. Histochemie 4: 135 (1964)
22. SMITH, E.E., : The Partial Purification of an
KAUFMAN, J.T., Amino Acid Naphthylamidase from
RUTENBURG, A.M. Human Liver. J. Biol. Chem. 240: 1718 (1965)
23. PATTERSON, E.K., : Studies on Dipeptidases and Amino-
SCHU-HSI HSIAO, peptidases I. Distinction between
KEPPEL, A. Leucine Aminopeptidase and Enzymes that Hydrolyze L-Leucyl- β -Naphthylamide. J. Biol. Chem. 238: 3611 (1963)
24. AXLINE, S.G. : Isozymes of Acid Phosphatase in Normal and Calmette-Guerin Bacillus-Induced Rabbit Alveolar Macrophages. J. Exp. Med. 128: 1031 (1968)

25. O'CONNELL, W., : Studies on an Enzyme in Human
WINZLER, R.J. Serum which Hydrolyzes Leucyl-
 β -Naphthylamide. Cancer Res.
23: 78 (1963)
26. SMITH, E.L., : Leucine Aminopeptidase. In the
HILL, R.L. Enzymes, edited by Boyer, P.D.,
Lardy, H. and Myrbäck, K., New
York, Academic Press Inc. 4:37
(1960)
27. PATTERSON, E.K., : Studies on Dipeptidases and
SHU-HSI HSIAO, Aminopeptidases II. Zonal Elec-
KEPPEL, A., trophoretic Separation of Rat
SOROF, S Liver Peptidases. J. Biol. Chem.
240: 710 (1965)
28. BEHAL, F.J., : Separation of Leucylaminopepti-
KANAVACE, C.B., dase Components in Normal Human
HAMILTON, P.D. Sera by DEAE Cellulose Column
Chromatography. Proc. Soc. Exp.
Biol. (N.Y.) 109: 411 (1962)
29. KOWLESSAR, O.D., : Localisation of Serum Leucine
HAFFNER, L.J., Aminopeptidase, 5-Nucleotidase
RILEY, E.M. and Nonspecific Alkaline Phos-
phatase by Starch-Gel Electro-
phoresis: Clinical and Biochemi-
cal Significance in Disease
States. Ann. N.Y. Acad. Sci. 94:
836 (1961)
30. SMITH, E.L., : Leucine Aminopeptidase V. Acti-
SPACKMAN, D.H. vation, Specificity and Mecha-
nism of Action. J. Biol. Chem.
212: 271 (1955)
31. HASCHEN, R. : Exopeptidasen des Menschlichen
Serums. Biochemie, Physiologie,
Pathophysiologie und Klinische
Bedeutung. Wiss. Z. Univ. Halle,
Math.-Nat. Reihe 11, 57 (1962)

32. GLENNER, G.G., : A Study of Aminopeptidase Activity
BURSTONE, M.S., in the Stroma of Neoplastic Tissue,
MEYER, D.B. with a Comparison of Histochemical
Techniques. J. Nat. Cancer Inst.
23: 857 (1959)

33. FOLK, J.E., : Chromogenic Leucyl Substrates for
BURSTONE, M.S. Aminopeptidase and Papain.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)
89: 473 (1955)

34. GRENN, M.N., : The Colorimetric Determination of
KWAN-CHUNG TSOU, Leucine Aminopeptidase Activity
BRESSLEP, R., with L-Leucyl- β -Naphthylamid Hydro-
SELIGMAN, A.M. chloride. Arch. Biochem. 57:
458 (1955)

35. SMITH, E.E., : Starch-Gel Electrophoresis of Hu-
RUTENBURG, A.M. man Tissue Enzymes which Hydrolyze
L-Leucyl- β -Naphthylamide.
Science 152: 1256 (1966)

36. FLEISHER, G.A., : Leucine Aminopeptidase in Human
WARMKA, C. Serum: Comparison of Hydrolysis of
L-Leucylglycine and L-Leucyl- β -
Naphthylamide. Clin. Chim. Acta
9: 259 (1964)

37. SMITH, E.E., : Electrophoretic Behaviour of an
RUTENBURG, A.M. Aminopeptidase of Human Tissues
and Serum. Nature 197: 800 (1963)

38. COHN, Z.A., : The Differentiation of Mononu-
BENSON, B. clear Phagocytes. Morphology,
Cytochemistry and Biochemistry.
J. Exp. Med. 121: 153 (1965)

39. COHN, Z.A., : The in Vitro Differentiation of
BENSON, B. Mononuclear Phagocytes. III. The
Reversibility of Granule and Hy-
drolytic Enzyme Formation and the
Turnover of Granule Constituents.
J. Exp. Med. 122: 455 (1965)

Herrn Professor Dr. rer. nat. Tibor Diamantstein,
unter dessen Leitung auch die vorliegende Dissertation
angefertigt wurde, danke ich für die Überlassung des
Themas.

Lebenslauf

Name: Bernd Wagner

Geburtsdatum 6. Mai 1940 in

und -ort: Fürstenwalde/Spree

Eltern: Georg Wagner und Johanna, geb. Klauke

Schulen: 1946 - 54 Grundschule in Fürstenwalde

1954 - 58 Oberschule in Fürstenwalde
mit Abitur

1958 - 59 Sonderlehrgang für Ostabitur-
ienten an der Lessing-Schule
in Berlin-Wedding

1. Studium: 1960 - 65 Studium an der Veterinärmedizi-
nischen Fakultät der Freien
Universität Berlin

1965 Staatsexamen an der Veterinär-
medizinischen Fakultät der FU
Berlin

1968 Promotion zum Dr. med. vet.
an der FU Berlin

2. Studium: 1965 - 70 Studium der Medizin an der
FU Berlin

1970 Staatsexamen an der Medizinischen
Fakultät der FU Berlin

1970 - 71 Medizinalassistentenzeit am
Klinikum-Steglitz

1971 Approbation als Arzt

1969 - Wissenschaftlicher Assistent im
Immunologischen Forschungslabor
des Klinikum Steglitz

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

